

شناسایی ۵ جهش جدید در ژن گلیکوپروتئین $Ib\alpha$ پلاکت در بیماران

برنارد - سولیر ایران

چکیده

زمینه و هدف: سندرم برنارد سولیر بیماری خونریزی دهنده ارثی است که به دلیل نقایص مولکولی کمپلکس GP Ib-IX-V (GlycoProtein) پلاکتی که از چهار زنجیره GP $Ib\alpha$, GP $Ib\beta$, GP IX, GP V تشکیل شده است، اتفاق می افتد. GP $Ib\alpha$ بزرگترین زنجیره این کمپلکس بوده و مسئول اتصال به لیگاند می باشد. بیشتر جهش های شناسایی شده در ارتباط با سندرم برنارد سولیر در GP $Ib\alpha$ بوده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی و شناسایی نقایص مولکولی ژن GP $Ib\alpha$ در بیماران برنارد سولیر ایرانی می باشد.

روش کار: این مطالعه به روش بررسی بیماران (Case series) انجام شد و با استفاده از بانک اطلاعاتی بیماری های خونریزی دهنده درمانگاه جامع هموفیلی ایران ۱۲ بیمار شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر پایه مطالعات فنوتیپی شامل شمارش پلاکت، بررسی لام خون محیطی و عدم پاسخدهی به آگونیست ریسستوستین صورت گرفته بود. DNA از ستونهای خونی بیماران و افراد وابسته جدا سازی شد. نواحی کد کننده ژن GP $Ib\alpha$ به ۵ قطعه هم پوشان تقسیم بندی و تکثیر انجام شد. از روش CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) استفاده گردید و نهایتاً توالی های دارای هترودوبلکس در ژل CSGE تعیین توالی شدند.

یافته ها: ۵ جهش جدید شناسایی شد: حذف ACCGGCT و جایگزینی GGA بین نوکلئوتیدهای ۴۲۵-۴۱۹، جهش های نقطه ای T_{704} , G_{710} , T_{710} , C_{710} و حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰. موتاسیون های شناسایی شده به بانک جهانی ژن فرستاده شد و ثبت گردید برای هر کدام از موتاسیون ها Restriction (RFLP) Fragment Length Polymorphism طراحی و انجام شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه نقایص مولکولی ژن زنجیره GP $Ib\alpha$ پلاکتها در بیماران BSS مورد مطالعه قرار گرفت و ۵ موتاسیون جدید که در سایر مطالعات شناسایی نشده بود، شناسایی گردید.

کلیدواژه ها: ۱- سندرم برنارد-سولیر ۲- گلیکوپروتئین $Ib\alpha$ ۳- تعیین توالی ۴- جهش

سیداسداله تقوی I

* دکتر احمد کاظمی II

دکتر قاسم رستگار لاری III

دکتر فریدون علا IV

مریم رسول زادگان V

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۳۰

مقدمه

می کند. GP $Ib\alpha$ (۳) بزرگترین زنجیره این کمپلکس بوده و مسئول اتصال به لیگاند می باشد. نقش GP Ib-IX-V اتصال پلاکتها به نواحی زیر اندوتلیوم آسیب دیده با واسطه فاکتور وان ویلبراند و تسهیل فعال سازی پلاکتها در غلظت های پایین ترومبین می باشد. به علاوه به نظر می رسد در تولید و سوخت و ساز پلاکتها دخیل باشد چون بیماران دارای نقص در این گلیکوپروتئین دچار کاهش تعداد پلاکت و افزایش اندازه پلاکت می باشند. (۵)

سندرم برنارد - سولیر بیماری خونریزی دهنده ارثی است که معمولاً با توارث اتوزوم مغلوب به ارث می رسد و شیوع آن در جمعیت های مختلف نزدیک به یک در میلیون می باشد. (۲،۱)

این سندرم به دلیل نقایص مولکولی گلیکوپروتئین GP Ib-IX-V پلاکت ایجاد می شود که از چهار زنجیره پلی پپتیدی GP $Ib\alpha$, GP $Ib\beta$, GP IX و GP V تشکیل شده است و به عنوان گیرنده برای فاکتور وان ویلبراند عمل

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی کد ۳۰۶/پ در سال ۱۳۸۶ انجام گردیده است.

- (I) کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
- (II) دانشیار گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (* مؤلف مسئول)
- (III) استادیار گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
- (IV) فوق تخصص هماتولوژی بالینی، درمانگاه جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران
- (V) کارشناس شیمی، درمانگاه جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران

از گلوبول‌های سفید استخراج گردید. با توجه به اینکه تمام توالی کد کننده زنجیره GP Iba در درون یک اگزون قرار داشته و این یک اگزون اندازه بزرگی دارد به ۵ قطعه تقسیم شد و مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) از روش Touch down استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای این ۵ قطعه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده

PRIMER SEQUENCE(5'-3')	PRIMER POSITION	PRIMER
A۱	۲۷۶۱-۲۷۸۰	gagagaaggacgg agtcgag
A۱R	۳۲۱۸-۳۱۹۹	gggtgtgtctttcggc aggt
A۲	۳۱۲۵-۳۱۴۴	ctgtgaggtctccaa agtgg
A۲R	۳۵۸۵-۳۵۶۶	tagccagactgagct tctcc
A۳	۳۵۱۱-۳۵۳۰	aaggcaatgagctg aagacc
A۳R	۴۱۰۸-۴۰۸۷	cttgtgttgatgca aggag
A۴	۴۰۵۶-۴۰۷۵	tccaactgttctctag acag
A۴R	۴۴۹۲-۴۴۷۳	ggctgatcaagtcca gggat
A۵	۴۳۹۴-۴۴۱۳	cacaagcctgatcac tccaa
A۵R	۴۹۷۸-۴۹۵۹	ttctctcaaggctcccc aac

CSGE: اساس CSGE بر مبنای تشکیل هترودوبلکس DNA ناشی از جفت شدن تصادفی زنجیره دارای موتاسیون با زنجیره سالم است. از این روش برای شناسایی اولیه موتاسیون‌ها استفاده شد که دو مرحله تقلیب و اتصال به ترتیب به مدت ۵ دقیقه 98°C و 30°C دقیقاً می‌باشد. در ژل CSGE از فرمامید، اتیلن گلیکول و BAP (1, 4-BisAcrolyl piperazine) به منظور افزایش حساسیت استفاده شد. قطعاتی که در ژل CSGE دارای هترودوبلکس بودند، تعیین توالی شدند که از متد سانجر استفاده شد به این منظور ۲ بار PCR انجام شد، PCR اول یک PCR معمولی بود که محصول خالص سازی شده آن برای PCR دوم که مخصوص سکانس

تشخیص سندرم برنارد - سولیر بر اساس کاهش تعداد پلاکت‌ها همراه باافزایش اندازه آن‌ها، افزایش مدت زمان خونروی و عدم پاسخدهی پلاکت‌ها درمقابل ریسستوستین و عدم تصحیح آن با افزودن پلاسمای نرمال صورت می‌گیرد، در تأیید تشخیص سندرم برنارد - سولیر مشاهدات اگریگومتری بایستی با انجام تست‌های بیوشیمیایی شامل اندازه گیری میزان GP Ib-IX-V و زنجیره‌های تشکیل دهنده آن در سطح پلاکت توسط فلوسیتومتری و یا ایمنوبلات و در نهایت با مطالعات ژنتیکی تأیید شود تا دقیقاً عامل اختلال عملکردی پلاکت تعیین شود.^(۱۵)

در ایران تا کنون هیچ مطالعه ژنتیکی بروی بیماران برنارد - سولیر انجام نشده بود. مطالعه ژنتیکی این بیماران جهت تشخیص قطعی بیماری، تعیین ناقلین، تشخیص قبل از تولد، کمک به تکمیل بانک جهانی ژن و ارائه روشی برای مطالعه این نواقص در آینده ضروری به نظر می‌رسید. از آن جا که زنجیره GP Iba نقش اتصال به لیگاند را عهده دار می‌باشد و بیشترین موتاسیون‌های گزارش شده در این زنجیره بوده است به عنوان اولین گام، بررسی نواقص مولکولی زنجیره GP Iba در این بیماران را شروع کردیم.

روش کار

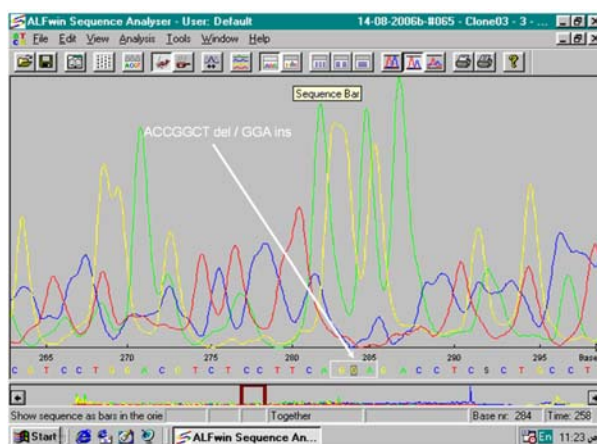
با کمک گرفتن ازبانک اطلاعاتی بیماری‌های خونریزی دهنده درمانگاه جامع هموفیلی، بیماران دارای سندرم برنارد - سولیر شناسایی و تعداد ۱۲ بیمار انتخاب گردید. تشخیص بیماری بر پایه مطالعات فنوتیپی شامل شمارش پلاکت، بررسی مورفولوژیک لام محیطی و عدم پاسخدهی پلاکت‌ها به ریسستوستین در حضور پلاسمای نرمال صورت گرفته بود. از بیماران و خانواده آنها، میزان ۱۵ میلی لیتر خون درضد انعقاد Na_2EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) جمع آوری شد و DNA ژنومی با استفاده از روش دستی پروتئیناز K، سدیم دودسیل سولفات، استات آمونیوم اشباع و بافر لیز گلوبول‌های سفید

یافته‌ها

یک بیمار در قطعه ۲، دو بیمار در قطعه ۳ و دو بیمار هم در قطعه ۵ دارای هترو دو بلکس در ژل CSGE بودند که تعیین توالی شدند. بررسی این توالی‌ها با توالی نرمال، حضور ۵ جهش جدید در ژن GP Iba را نشان داد که این جهش‌ها (شکل شماره ۱) شامل موارد زیر می‌باشد: حذف ACCGGCT و جایگزینی GGA بین نوکلئوتیدهای ۴۲۵-۴۱۹، جهش‌های نقطه‌ای C_{۷۰۹}T، A_{۷۱۰}G، T_{۷۰۹}C و حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰. جهش‌های شناسایی شده بوسیله روش RFLP به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده BsiYI، BsiYI و TaqI، ECORII، MspI بررسی و تایید شدند.

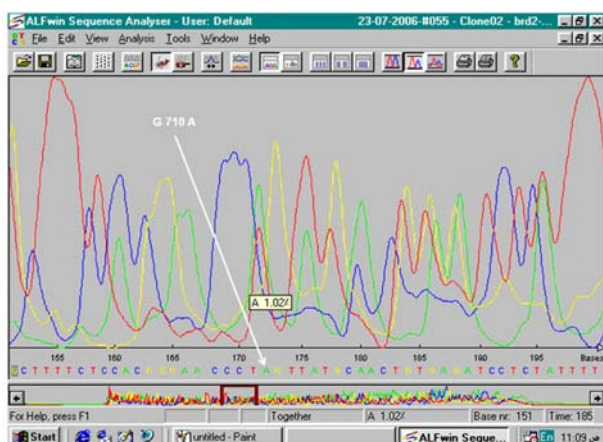
است مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR و خالص سازی محصول آن از کیت شرکت سیگما و کیاژن استفاده شد. برای تعیین توالی از دستگاه Pharmasia Amersham و برای بررسی توالی نوکلئوتیدها از نرم افزار ALF express sequence analysis استفاده گردید.

RFLP: با استفاده از نرم افزار Gene Runner، الگوی تغییرات برش توسط آنزیم‌های محدود کننده بررسی، آنزیم مناسب انتخاب و تکنیک RFLP برای موتاسیون‌های یافته شده طراحی و انجام شد. حضور موتاسیون می‌تواند با تغییر توالی ژن، الگوی برش را تغییر دهد که از این روش برای ردیابی و تایید حضور موتاسیون استفاده شد.



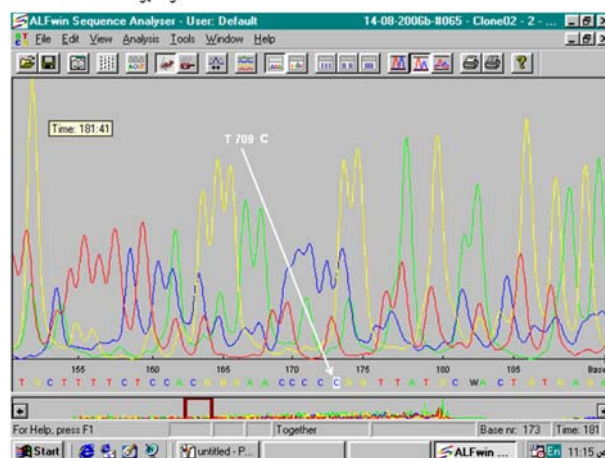
CGTCCTGGACGTCTCCTTCAACCGGCTGACCTCGCTGCCTCTTGGTGCCCT

موتاسیون Deletion ACCGGCT/Insertion GGA همراه با توالی نرمال



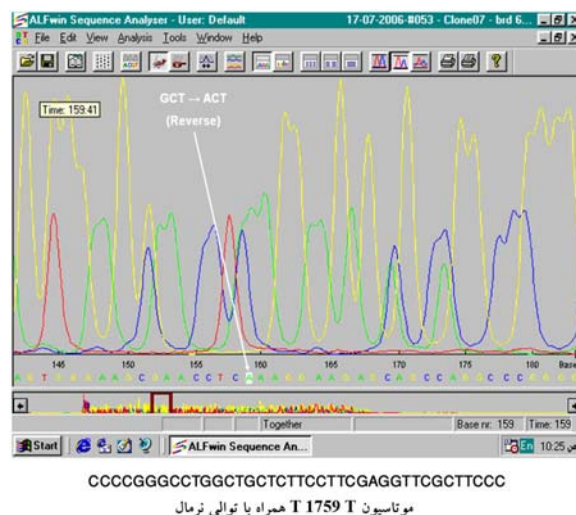
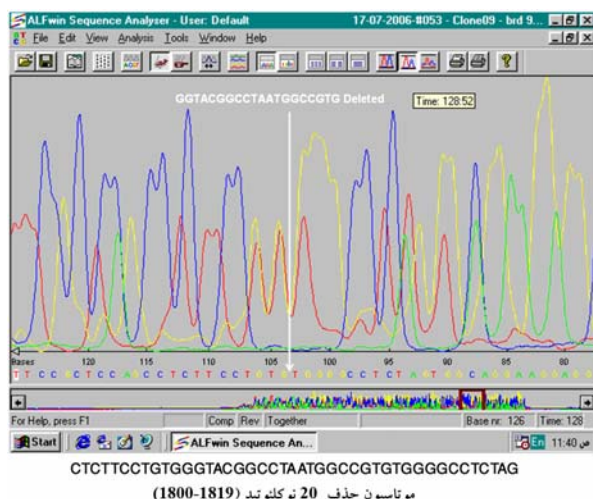
TCTCCACGGGAACCCCTGGTTATGCAACTGTGAGATCCTCTATT

موتاسیون G 710 A همراه با توالی نرمال



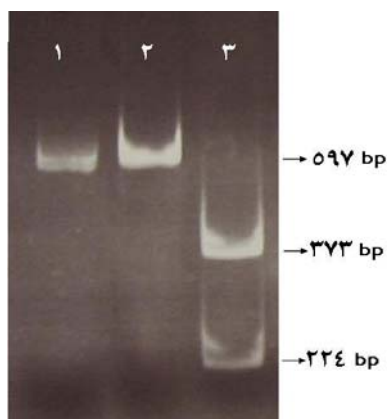
CTTTTCTCCACGGGAACCCCTGGTTATGCAACTGTGA

موتاسیون T 709 C همراه با توالی نرمال



شکل شماره ۱- حضور ۵ جهش جدید در ژن Iba GP

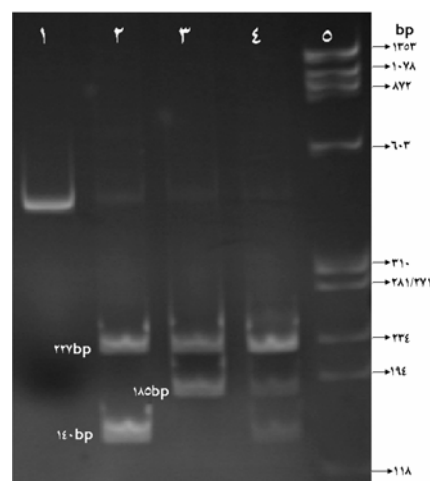
موتاسیون C_{۷۰۹}T باعث ایجاد یک محل برش برای آنزیم MspI در موقعیت ۲۲۴ در قطعه ۳ می‌شود. درحالی که قطعه سالم محل برشی برای این آنزیم وجود ندارد. بنابراین با هضم آنزیمی قطعه سالم یک قطعه ۵۹۷ حاصل می‌شود. در حالی که با هضم آنزیمی قطعه موتانت دو قطعه ۲۲۴ و ۳۷۳ حاصل می‌شود (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون C_{۷۰۹}T توسط MspI. شماره ۱ محصول هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ نمونه فرد بیمار (هموزیگوت) را نشان می‌دهد. طول قطعه ۵۹۷ جفت باز است که از هضم آنزیمی آن در فرد دارای موتاسیون دو قطعه ۳۷۳ و ۲۲۴ حاصل می‌شود در حالی که در فرد سالم قطعه ۵۹۷ جفت بازی دست نخورده باقی می‌ماند.

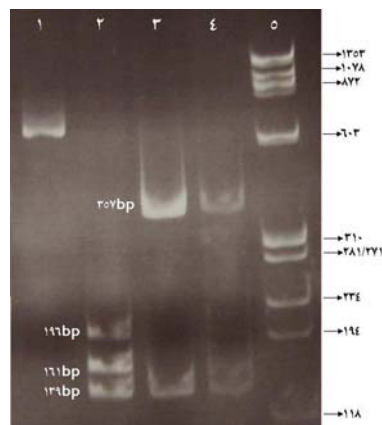
موتاسیون A_{۷۱۰}G باعث حذف یک محل برش EcorII در قطعه ۳ (۲۲۲) می‌شود. از هضم آنزیمی قطعه سالم ۵ قطعه ۲۶، ۷۵، ۱۳۹، ۱۶۱ و ۱۹۶ جفت بازی

موتاسیون GGA/Ins ACCGGCT باعث حذف یک محل برش آنزیم BsiYI در موقعیت ۳۲۱ قطعه ۲ می‌شود. هضم آنزیمی قطعه سالم، ۴ قطعه به اندازه های ۸، ۴۵، ۱۴۰، ۲۲۷ و نتیجه هضم آنزیمی قطعه موتانت ۳ قطعه ۸، ۴۵، ۱۸۵ و ۲۲۷ می‌باشد (شکل شماره ۲). با توجه به اینکه در حرکت الکتروفورز قطعه ۴۵ و ۸ با هم حرکت می‌کنند، انتظار می‌رود در ژل الکتروفورز قطعه سالم ۳ باند ۸، ۴۵، ۱۴۰، ۲۲۷ مشاهده شود و در قطعه موتانت ۳ باند ۸، ۴۵، ۱۸۵ و ۲۲۷. طول قطعه هضم نشده ۴۶۱ جفت باز می‌باشد.



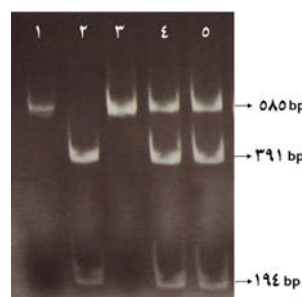
شکل شماره ۲- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون ACCGGCT توسط BsiYI. شماره ۱ محصول هضم نشده، شماره ۲ سالم، شماره ۳ بیمار (هموزیگوت)، شماره ۴ والد بیمار (هتروزیگوت) و شماره ۵ مارکر می‌باشد. قطعه ۴۸ از ژل بیرون رفته و همان طور که مشاهده می‌شود فرد بیمار دارای دو قطعه ۲۲۷ و ۱۸۵ و فرد نرمال دارای دو قطعه ۲۲۷ و ۱۴۰ جفت بازی می‌باشد.

حاصل می‌شود و از هضم آنزیمی قطعه موتانت ۴ قطعه ۲۶، ۷۵، ۱۳۹ و ۳۵۷ (شکل شماره ۴). قطعه‌های ۲۶ و ۷۵ جفت بازی هنگام الکتروفورز از ژل بیرون رفته، در فرد سالم قطعات ۱۶۱، ۱۹۶ و ۱۳۹ مشاهده می‌شود در حالی که در فرد بیمار قطعات ۳۵۷ و ۱۳۹ جفت بازی مشاهده می‌شود.



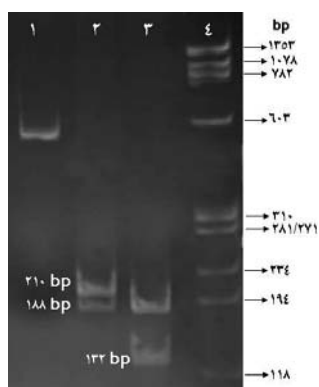
شکل شماره ۴- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون $G_{110}A$ توسط $EcoRI$. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ و ۴ نمونه بیمار می‌باشند و شماره ۵ مارکر. باندهای ۲۶ و ۷۵ جفت بازی از ژل بیرون رفته و در نتیجه در قطعه سالم باندهای ۱۹۶، ۱۶۱ و ۱۳۹ جفت بازی و قطعه موتانت باند های ۳۵۷ و ۱۳۹ بازی مشاهده می‌شود.

موتاسیون $C_{170}T$ باعث حذف یک محل برش $TaqI$ در قطعه ۵ می‌شود. $TaqI$ قطعه سالم را در ۳۹۱ برش داده ولی قادر به برش در قطعه موتانت نمی‌باشد (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵- هضم آنزیمی قطعه دارای موتاسیون $C_{170}T$ توسط $TaqI$ را نشان می‌دهد. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نمونه فرد سالم، شماره ۳ نمونه فرد بیمار (هموزیگوت)، شماره‌های ۴ و ۵ نمونه والدین بیمار می‌باشند. فرد سالم دارای دو باند ۳۹۱ و ۱۹۴ جفت بازی بوده در حالی که بیمار تنها دارای باند ۵۸۵ می‌باشد. افراد هتروزیگوت (والدین) هر سه باند ۳۹۱، ۵۸۵ و ۱۹۴ جفت بازی را دارا هستند.

با حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰، طول قطعه موتانت ۵۶۵ نوکلئوتید می‌شود که باعث تغییر الگوی آنزیم $BsiYI$ می‌شود. قطعه سالم دو محل برش در موقعیت‌های ۱۸۷ و ۳۷۵ دارد که از هضم آنزیمی آن ۳ قطعه ۱۸۸، ۱۸۷ و ۲۱۰ حاصل می‌شود. قطعه موتانت سه محل برش در موقعیت‌های ۴۳۳، ۳۷۵ و ۱۸۷ دارد که از هضم آنزیمی آن چهار قطعه ۵۸، ۱۸۷، ۱۸۸ و ۱۳۲ حاصل می‌شود (شکل شماره ۶). قطعه ۱۸۷ و ۱۸۸ قابل تفکیک از هم نبوده و انتظار می‌رود قطعه سالم دو باند ۱۸۷ و ۲۱۰ داشته باشد و قطعه موتانت ۳ باند ۵۸، ۱۳۲ و ۱۸۷ داشته باشد. به هنگام الکتروفورز، قطعه ۵۸ جفت بازی از ژل بیرون رفته، در بیمار دو قطعه ۱۳۲ و ۱۸۷ جفت بازی و در نرمال دو قطعه ۱۸۷ و ۲۱۰ جفت بازی مشاهده می‌شود.



شکل شماره ۶- هضم آنزیمی قطعه دارای حذف ۲۰ نوکلئوتید را توسط $BsiYI$ نشان می‌دهد. شماره ۱ نمونه هضم نشده، شماره ۲ نرمال، شماره ۳ بیمار و شماره ۴ مارکر می‌باشد. در نرمال دو قطعه ۱۸۸ و ۲۱۰ جفت بازی و در بیمار دو قطعه ۱۳۲ و ۱۸۸ جفت بازی مشاهده می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

۵ موتاسیون شناسایی شده در این مطالعه جدید بوده و برای اولین بار گزارش می‌شود. حذف $ACCGGCT$ و جایگزینی GGA بین نوکلئوتیدهای ۴۲۵-۴۱۹ در ناحیه کد کننده دومن خارج سلولی اتفاق افتاده است. با توجه به حذف ۷ نوکلئوتید

و جایگزینی ۳ نوکلئوتید دیگر قالب توالی‌های کد کننده برای زنجیره GP Iba تغییر کرده و زنجیره پس از ۲۱ اسید آمینه به انتها می‌رسد. زنجیره موتانت ۱۳۰ اسید آمینه داشته و نسبت به زنجیره سالم ۴۸۰ اسید آمینه کمتر طول دارد. در نتیجه این زنجیره ناقص بوده، و به نظر می‌رسد پس از سنتز، قادر به برقراری ارتباط با سایر زنجیره‌ها نبوده و باعث عدم شکل‌گیری کمپلکس در سطح سلول می‌شود. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم BsiI می‌گردد که می‌تواند پایه طراحی RFLP برای رد یابی این موتاسیون باشد.

موتاسیون T_{۷۰۹}C باعث تغییر کدون ۲۰۷ TGG به CGG می‌شود که در نتیجه آن اسید آمینه آرژنین جایگزین تریپتوفان می‌شود. موتاسیون از نوع Missence mutation بوده و جایگزینی اسید آمینه آرژنین به جای تریپتوفان باعث اختلال در ساختمان فضایی زنجیره GP Iba شده به نحوی که عملکرد و احتمالاً پایداری آن را مختل می‌کند. تریپتوفان ۲۰۷ در داخل ساختار لوپ دی سولفیدی و توالی‌های غنی از لوسین قرار داشته و در این منطقه با ۷ اسید آمینه احاطه کننده آن که ۴ تای آن‌ها در داخل آخرین توالی غنی از لوسین و ۳ تای آن‌ها در درون لوپ دی سولفیدی قرار گرفته اند در ارتباط بوده که این ارتباط از نوع هیدروفوبیک بوده و جایگزینی تریپتوفان ۲۰۷ با سایر اسید آمینه‌های غیر هیدروفوب باعث بهم خوردن این ارتباط شده و در نتیجه زنجیره تا خوردگی غیر طبیعی پیدا کرده و به تسریع تجزیه زنجیره و ناپایداری آن منجر می‌شود.^(۷) تریپتوفان یک اسید آمینه حفظ شده (Conserved) بوده و در هر چهار زنجیره تشکیل دهنده کمپلکس دیده می‌شود. به علاوه در سایر پروتئین‌های خانواده دارای تکرارهای غنی از لوسین هم در این موقعیت تریپتوفان یا سایر اسید آمینه‌های هیدروفوب مثل لوسین یا فنیل آلانین قرار می‌گیرند که همین امر اهمیت این اسید آمینه را در حفظ ساختار و عملکرد

پروتئین‌های دارای توالی‌های غنی از لوسین نشان می‌دهد و مطرح می‌کند که تغییر هیدروفوبیسیته به دلیل جایگزینی اسید آمینه‌های هیدروفیل در این منطقه باعث ناپایداری زنجیره و اختلال در عملکرد آن می‌شوند.^(۷) این موتاسیون باعث ایجاد یک محل برش برای MspI می‌شود که می‌توان پایه طراحی RFLP قرار داده شود و از آن برای تشخیص بیماری در افراد وابسته و تعیین ناقلین و تشخیص قبل از تولد در بستگان بیمار استفاده کرد.

موتاسیون G_{۷۱۰}A که یک جهش پوچ است، باعث تغییر TGG کدون تریپتوفان ۲۰۷ به کدون خاتمه گر TAG می‌شود که در نتیجه این موتاسیون زنجیره GP Iba ناقصی سنتز می‌شود که ۲۰۶ اسید آمینه طول داشته و فاقد توالی‌های سیتوپلاسمی، توالی داخل غشایی و دومن ماکروگلیکوپتید می‌باشد. این زنجیره ناقص قادر به ایجاد ارتباط با سایر زنجیره‌ها نبوده، قرار گیری آن در سطح غشا پلاکت مختل می‌شود. بنابر این انتظار می‌رود زنجیره پس از سنتز تجزیه شود. مطالعات بیوشیمیایی و بیان سلولی برای درک بهتر این موتاسیون لازم است. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم EcorII می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP برای پیگیری موتاسیون در سایر افراد وابسته و تعیین ناقلین قرار گیرد.

موتاسیون C_{۱۷۰۹}T هم یک نوع موتاسیون پوچ است که باعث تغییر CGA کدون آرژنین ۵۵۷ به TGA کدون خاتمه گر می‌شود و توالی سیتوپلاسمی زنجیره GP Iba را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه این موتاسیون زنجیره پلی پپتیدی ناقصی سنتز می‌شود که ۵۵۶ اسید آمینه طول دارد این زنجیره ناقص واجد دومن‌های خارج سلولی و داخل غشایی بوده اما بخشی از توالی سیتوپلاسمی آن حذف شده است. قسمت حذف شده توالی لازم برای اتصال به فیلامان و پروتئین‌های ۳-۱۴ می‌باشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که

ارتباط توالی سیتوپلاسمی زنجیره‌های تشکیل دهنده کمپلکس با پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ نقش تنظیم کنندگی عملکرد کمپلکس را بر عهده دارند. به علاوه ارتباط این توالی‌ها با فیلامان باعث حفظ سیتواسکلتون سلولی و تنظیم فعالیت کمپلکس می‌شود.^(۸-۱۲) با توجه به این که در این بیمار توالی C ترمینال زنجیره GP Iba حاوی محل‌های اتصال برای پروتئین ۳-۳-۱۴ و فیلامان A، حذف شده است، ارتباط کمپلکس با سیتواسکلتون سلولی به هم می‌خورد و به علاوه روند انتقال پیام مختل شده و کمپلکس قادر به برقراری پیام‌های ناشی از اتصال دومن خارج سلولی به لیگاندها نمی‌باشد. این مطالب نشان می‌دهد که موتاسیون باعث اختلال در عملکرد کمپلکس شده و روند وقایع انتقال پیام و ارتباط آن با سیتواسکلتون سلولی را مختل می‌کند. این موتاسیون باعث حذف یک محل برش برای آنزیم محدود کننده Taq۱ می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP قرار گیرد و در تعیین ناقلین مورد استفاده قرار گیرد.

حذف ۲۰ نوکلئوتید در موقعیت ۱۸۱۹-۱۸۰۰ باعث سنتز زنجیره ناقصی می‌شود که ۵۹۷ اسید آمینه طول داشته و زنجیره پس از سنتز ۲۹ اسید آمینه جدید به پایان می‌رسد. این زنجیره ناقص ۱۳ اسید آمینه کوتاه‌تر از زنجیره اصلی بوده و توالی C ترمینال آن به طول ۲۹ اسید آمینه از توالی C ترمینال زنجیره سالم متفاوت است. مطالعات Invitro نشان داده شده است که حذف C ترمینال زنجیره GP Iba که حاوی Ser ۶۰۹ است، محل اتصال با تمایل بالا برای پروتئین ۳-۳-۱۴ بوده و اتصال این پروتئین به توالی C ترمینال زنجیره GP Iba تنظیم کننده عملکرد کمپلکس است.^(۱۳،۱۲) بنابر این انتظار می‌رود این جهش ارتباط پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ و فیلامان به دومن سیتوپلاسمی کمپلکس را مختل کرده و در نتیجه کمپلکس عملکرد خود را از دست بدهد. به علاوه افزوده شدن ۲۹ اسید آمینه جدید در توالی

سیتوپلاسمی زنجیره GP Iba، ممکن است باعث تغییر هیدروفوبیسیته زنجیره شود که نیاز به بررسی بیوشیمیایی و تعیین میزان هیدروفوبیسیته با استفاده از نرم‌افزارهای موجود مثل Genepro software دارد. شبیه به سایر موتاسیون‌های شناسایی شده در این مطالعه، این موتاسیون جدید بوده و در مطالعات قبلی در نقاط مختلف دنیا گزارش نشده است. به علاوه این موتاسیون به همراه C_{۱۷۵۹}T اولین موتاسیون‌های گزارش شده در دومن سیتوپلاسمی زنجیره GP Iba می‌باشند و همین طور این موتاسیون اولین Deletion mutation در دومن سیتوپلاسمی GP Iba می‌باشد. حضور این موتاسیون باعث تغییر الگوی برش آنزیم محدود کننده Bsi۱ می‌شود که می‌تواند پایه طراحی روش RFLP برای رد یابی این موتاسیون در بستگان بیمار قرار گیرد.

بسیاری از اطلاعات ما در مورد نقش موتاسیون‌ها بر عملکرد کمپلکس، از مطالعه بیماران برنارد-سولیر حاصل شده است. از آن جا که تا کنون در دومن سیتوپلاسمی موتاسیونی گزارش نشده بود، اطلاعات خاصی راجع به نقش این موتاسیون‌ها از بیماران برنارد سولیر بدست نیامده است. برای درک بهتر نقش این موتاسیون‌ها در عرضه و بیان کمپلکس مطالعات بیوشیمیایی و بیان سلولی ضروری می‌باشد که از محدودیت‌های این پژوهش بوده و امید است پژوهش انجام شده بستر مناسبی را برای این کار فراهم آورد. همچنین در مورد بیمارانی که در ژن زنجیره GP Iba دارای موتاسیون نبودند بررسی ژن سایر زنجیره‌ها ضروری بوده که در این مطالعه به آن پرداخته نشده است.

در این مطالعه نقایص مولکولی ژن زنجیره GP Iba مورد مطالعه قرار گرفت و ۵ موتاسیون جدید که در سایر مطالعات شناسایی نشده بود، شناسایی گردید. برای هر کدام از موتاسیون‌ها RFLP (Restriction)

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی کد ۳۰۶/پ انجام گردیده است که بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر نویسندگان اعلام می‌گردد.

Fragment Length Polymorphism طراحی و انجام شد. معرفی روش مطالعه این ژن و شناسایی نواقص مولکولی آن می‌تواند آغاز تشخیص‌های مولکولی، تعیین ناقلین و کمک به تکمیل بانک اطلاعات بیماری‌های خوریزی دهنده نادر در کشور باشد.

فهرست منابع

1-Afshar-Kharghan V, Lo'pez JA. Bernard-Soulier syndrome caused by a dinucleotide deletion and reading frame shift in the region encoding the glycoprotein Iba transmembrane domain. *Blood*. 1997; 90: 2634-643

2-Sachs UJH, Kroll H, Matzdorff AC, Berghofer H, Lopez JA, Santoso S. Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous asn-45ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. *Brit J Haemat*. 2003; 123: 127-31

3-Rivera CE, Villagra J, Riordan M, Williams S, Lindstrom KJ, Rick ME. Identification of a new mutation in platelet glycoprotein IX in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haem*. 2001; 112: 105-8

4-Drouin J, Carson NL, Laneuville O. Compound heterozygosity for a novel nine-nucleotide deletion and the Asn45Ser missense mutation in the glycoprotein IX gene in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *AmJ Hematol*. 2005; 78(1):41-48

5-Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt M.C. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998; 91: 4397-418

6-Provan A, Gribben J. *Molecular hematology*. 2nd edition. Oxford: Blackwell science; 2005. p. 210-17

7-Rosenberg N, Lalezari S, Landau M, Shenkman B, Seligsohn U, Izraeli S. Trp207Gly in platelet glycoprotein Iba is a novel mutation which disrupts the

connection between the leucine-rich repeat domain and the disulfide loop structure and causes Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 378-86

8-Mangin P, David T, Lavaud V, Cranmer SL, Pikovski I, Jackson SP, et al. Identification of a novel 14-3-3ζ binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibζ. *Blood*. 2004; 104: 420-27

9-Feng S, Christodoulides N, Resendiz JC, Berndt MC, Kroll H. Cytoplasmic domains of Gplba and Gplbb regulate 14-3-3ζ binding to Gplb/IX/V. *Blood*. 2000; 95: 551-57

10-Berndt MC, Cranmer SL, Andrews RK. Filamin a interaction with GPIb: the platelet shapes up. *Blood*. 2006; 107: 1745

11-Bodnar RJ, Xi X, Li Z, Berndt MC, Du X. Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ib beta. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47080-87

12-Bodnar RJ, Gu M, Li Z, Englund GD, Du X. The cytoplasmic domain of the platelet glycoprotein Ib_β is phosphorylated at serine609. *J Biol Chem*. 1999; 274: 33474-479

13-Dai K, Bodnar RJ, Berndt MC, Du X. A critical role for 14-3-3ζ protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. *Blood*. 2005; 106: 1975-981

Identification of Five Novel Mutations in Platelet GPIb α Gene among Iranian Bernard-Soulier Patients

S.A. Taghavi, MSc^I * A. Kazemi, PhD^{II} .Rastegar Lari, PhD^{III}
F. Ala, MD^{IV} M. Rasoolzadegan, BSc^V

Abstract

Background & Aim: Bernard-Soulier syndrome (B.S.S) is a rare hereditary bleeding disorder due to molecular defects of platelet GPIb-IX-V. The GPIb-IX-V complex is composed of four chains of GPIba, GPIb β , GPIX and GPV. The largest chain of this complex is GPIba and is responsible for binding to ligand and most of identified mutations belong to this glycoprotein. The aim of this study was to identify the molecular defects of GPIba gene in Iranian Bernard-Soulier patients.

Patients and Method: Twelve Bernard-Soulier patients were selected from data base of bleeding disorders in Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia Center. Diagnostic criteria for B.S.S were based on phenotypic analysis such as platelet counts, inspection of peripheral blood smear and lack of response to ristocetin agonist. Genomic DNA was isolated from blood leukocytes of the patients and their parents. The entire amino acid coding region in exon 2 from GPIba was divided into five overlapping fragments and PCR amplification was done. Finally, sequence analysis of the coding regions that contain DNA heteroduplexes in CSGE gels was performed.

Results: Sequence analysis revealed five novel mutations in GPIba. The mutations include ACCGGCT deletion, GGA insertion in 419-425 position, missense mutations in T709C, G710A and C1759T, and the deletion of 20 nucleotides in 1800-1819 position. All five novel mutations were registered in International Gene Bank and for each mutation RFLP (restriction fragment length polymorphism) design was created.

Conclusion: In the present study, the molecular defects of GPIba gene was investigated and five novel mutations were identified among Iranian BSS patients.

Key Words: 1) Bernard-Soulier Syndrome 2) Glycoprotein Iba
3) Sequence Analysis 4) Mutation

This research was financed by Iran University of Medical Sciences and Health Services.

I) MSc in Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

*II) Associate Professor of Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*

III) Assistant Professor of Hematology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

IV) Subspecialist in Clinical Hematology. Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia center. Tehran, Iran.

V) BSc in Chemistry. Comprehensive Clinic of Iranian Hemophilia center. Tehran, Iran.